

06.12.2004

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

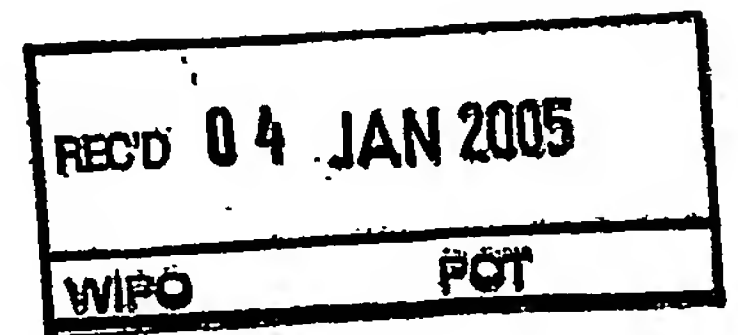
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年11月11日

出願番号  
Application Number: 特願2003-381470

[ST. 10/C]: [JP 2003-381470]

出願人  
Applicant(s): 株式会社資生堂



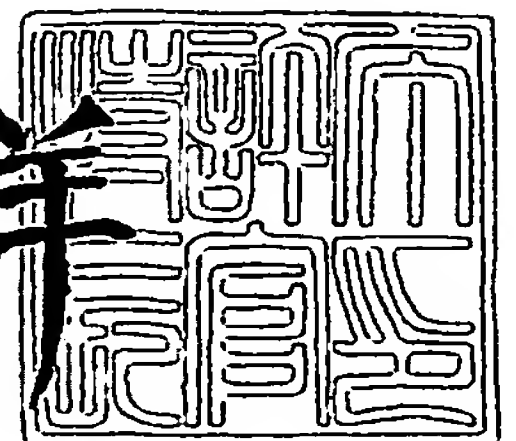
**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年11月24日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川

洋



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願  
【整理番号】 1034465  
【提出日】 平成15年11月11日  
【あて先】 特許庁長官 今井 康夫 殿  
【国際特許分類】 A61K 7/06  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区早渕 2 - 2 - 1 株式会社資生堂 リサーチセンター（新横浜）内  
【氏名】 江浜 律子  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区早渕 2 - 2 - 1 株式会社資生堂 リサーチセンター（新横浜）内  
【氏名】 飯野 雅人  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区早渕 2 - 2 - 1 株式会社資生堂 リサーチセンター（新横浜）内  
【氏名】 中沢 陽介  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区早渕 2 - 2 - 1 株式会社資生堂 リサーチセンター（新横浜）内  
【氏名】 田島 正裕  
【発明者】  
【住所又は居所】 東京都中央区銀座 7 - 5 - 5 株式会社資生堂内  
【氏名】 尾郷 正志  
【発明者】  
【住所又は居所】 徳島県徳島市蔵本町 2 - 5 0 - 1 徳島大学医学部付属病院内  
【氏名】 荒瀬 誠治  
【特許出願人】  
【識別番号】 000001959  
【氏名又は名称】 株式会社資生堂  
【代理人】  
【識別番号】 100099759  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 青木 篤  
【電話番号】 03-5470-1900  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100077517  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 石田 敬  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100087413  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 古賀 哲次  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100117019  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 渡辺 陽一



【選任した代理人】  
【識別番号】 100082898  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 西山 雅也  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 209382  
【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0305959

## 【書類名】 特許請求の範囲

## 【請求項 1】

毛包の細胞におけるケラチノサイト増殖因子 (FGF-7) の発現を亢進させることを特徴とする、毛髪の太毛化を維持・促進する方法。

## 【請求項 2】

アデノシン、アデノシン 5' - リン酸、アデノシン 5' - リン酸の塩、CCPA (2-クロロ-N<sup>6</sup>-シクロペンチルアデノシン)、CI-IB-MECA (2-クロロ-N<sup>6</sup>-(3-ヨードベンジル)-9-[5-(メチルカルバモイル)-β-D-リボフラノシル] アデニン) 及び NECA (N-エチルカルボキシアミドアデノシン) から成る群から選ばれる、毛包の細胞における FGF-7 の発現を亢進させる 1 又は複数種の薬剤を含有する皮膚外用剤を頭皮に塗布することにより前記 FGF-7 の発現を亢進させる、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

前記毛包の細胞における FGF-7 の発現を亢進させる薬剤の少なくとも 1 種がアデノシンである、請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 4】

前記毛包の細胞が毛乳頭細胞又は外毛根鞘細胞である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 5】

アデノシン、アデノシン 5' - リン酸、アデノシン 5' - リン酸の塩、CCPA、CI-IB-MECA 及び NECA から成る群から選ばれる薬剤を活性成分として含有する、FGF-7 発現亢進組成物。

## 【請求項 6】

前記薬剤の少なくとも 1 種の薬剤がアデノシンである、請求項 5 記載の組成物。

## 【請求項 7】

頭皮に塗布することにより毛髪の太毛化を維持・促進させる皮膚外用剤である、請求項 5 又は 6 記載の組成物。

## 【請求項 8】

毛髪の太毛化を維持・促進させる薬剤のスクリーニング方法であって、候補薬剤を細胞に適用し、当該細胞の FGF-7 の発現を亢進させる薬剤を選定することを特徴とする方法。

## 【請求項 9】

前記細胞の FGF-7 の発現の亢進が、細胞から抽出された FGF-7 をコードする mRNA の量を測定することにより決定される、請求項 8 記載の方法。

## 【請求項 10】

前記細胞が毛乳頭細胞、不死化毛乳頭細胞又は外毛根鞘細胞である、請求項 8 又は 9 記載の方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 毛髪の太毛化の方法及び組成物

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は毛包の細胞、好ましくは毛乳頭細胞におけるケラチノサイト増殖因子（F G F - 7）の発現を亢進させることにより毛髪の太毛化を維持・促進する方法、及びF G F - 7の発現を亢進させる組成物、特に毛髪の太毛化を維持・促進するための頭皮外用剤に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

高齢化社会、ストレス社会といわれる現代社会では、頭部毛髪が様々な原因により脱毛の危機にさらされる機会がますます多くなっている。これに対応して、より優れた「育毛料」を提供すべく様々な試みがなされている。育毛料が毛髪に与える効果として主なものに、1)発毛誘導効果（発毛促進効果、成長期誘導効果）、2)毛髪の太さを維持する又はその太さを太くする、即ち、太毛化効果、3)毛髪成長期延長効果、4)5 $\alpha$ -レダクターゼ阻害効果（退行期早期移行抑制効果）、5)血行促進効果、6)殺菌効果、7)フケ防止効果、8)保湿効果、9)抗酸化効果等が挙げられる。

【0 0 0 3】

男性型脱毛は、毛髪成長期の短縮により毛包が矮小化し、毛髪径が次第に減少してうぶ毛に変化することによって特徴づけられ、男性型脱毛者では、毛髪密度（単位面積当たりの毛髪数）の減少はほとんど認められないのに対し、毛髪径が極端に減少するという事実が見出されている（特開 2 0 0 2 - 3 2 2 0 9 4 号公報）。この事実に基づき、発毛誘導のみならず、上記太毛化効果の重要性にも注目されている。

【0 0 0 4】

しかしながら、毛髪の太毛化にどのようなメカニズムが関与しているかについては生化学・分子生物学レベルにおいて未だ解明に至っておらず、その結果、太毛化の維持・促進に有効な薬剤を含有する育毛料の研究・開発も模索段階にあるといえよう。毛髪の太毛化のメカニズムが十分に解明できれば、既存の育毛料に比べ一層顕著な効果を奏するものの提供が可能となり得る。

【特許文献 1】 特開 2 0 0 2 - 3 2 2 0 9 4 号公報

【特許文献 2】 特開 2 0 0 0 - 2 9 7 0 1 5 号公報

【特許文献 3】 特開 2 0 0 0 - 1 9 8 7 1 8 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 5】

本発明は、毛髪の太毛化のメカニズムの生化学レベルでの解明、さらには毛髪の太毛化を維持・促進する方法及びそのための皮膚外用組成物の提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 6】

F G F - 7 は 1 9 4 個のアミノ酸から成る糖蛋白質で、線維芽細胞増殖因子のファミリーに属する成長因子の一つである。間葉系細胞である皮膚線維芽細胞などで分泌され、表皮細胞に存在する特異的レセプターである F G F R 2 III b に結合してパラクラインにその増殖を促進することはよく知られた事実である（Rubin J. S. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86:802-806; Marchese C ら、J. Cell Physiol. 1990, 144:326-332など）。また、表皮ケラチノサイトのみならず、肝実質細胞、腸管上皮細胞（Houseley R. M ら、J. Clin. Invest. 1994, 94:1764-1777）など広く上皮系細胞の増殖を促進し、毛包のケラチノサイトもこの F G F - 7 により増殖が促進されることが示されている（Pierce G. F. ら、J. Exp. Med. 1994, 179:831-840）。また、マウスの実験から F G F - 7 が成長期の毛乳頭細胞で発現し、その機能表現に必須であるレセプター F G F R 2 が毛乳頭近傍の毛母で発現していることが示され（Dev. Dyn. 1996; 205(4):379-386）、毛成長に F G



FGF-7 が関与していることが示唆されている。しかしながら、FGF-7 が毛成長においてどのような役割を果たしているかは解明されていない。そこで我々は、毛乳頭細胞において FGF-7 の発現を亢進させれば、そのターゲット細胞と考えられる毛母細胞などの増殖を介して、毛髪成長期延長作用による太毛化につながるのではないかという作業仮説を立てた。

#### 【0007】

まず、様々な薬剤を毛乳頭細胞などに作用させて FGF-7 の発現を上昇させるものを探索したところ、アデノシン及びその誘導体が FGF-7 遺伝子の発現を亢進させることがわかった。次に、アデノシンについての臨床試験を行ったところ、驚くべきことに太毛化効果をも有することが見出された。太毛化の維持・促進には特開 2002-322094 号公報に記載の通り、毛髪成長期延長により毛成長促進作用効果を発揮する成分（例えばクララ属植物エキス）、退行期への早期移行を抑制することにより脱毛防止作用効果を発揮する成分（例えばテストテロン）、及び休止期から成長期に至る誘導作用効果を発揮する成分（例えば、デシルテトラデシルアミンオキシド）の少なくとも 3 種の成分が必要であると考えられていたため、単独化合物がこのような効果を奏することは驚くべきことである。

#### 【0008】

FGF-7 の毛乳頭細胞などにおける発現が亢進されるといった事実は初めて見出されたものであり、ましてやその発現の亢進が毛髪の太毛化に関与するといった事実は全く初めて見出されたものである。

#### 【0009】

従って、本発明は、毛包の細胞、好ましくは毛乳頭細胞におけるケラチノサイト増殖因子（FGF-7）の発現を亢進させることを特徴とする、毛髪の太毛化を維持・促進する方法を提供する。

#### 【0010】

毛包の細胞における FGF-7 の発現の亢進は、アデノシン及びその誘導体、例えば、アデノシン 5' - リン酸、アデノシン 5' - リン酸の塩、並びに CCPA（2-クロロ-N<sup>6</sup>-シクロペンチルアデノシン）、C1-IB-MECA（2-クロロ-N<sup>6</sup>-(3-ヨードベンジル)-9-[5-(メチルカルバモイル)-β-D-リボフラノシル] アデニン）及び NECA（N-エチルカルボキシアミドアデノシン）から成る群から選ばれる毛包の細胞における FGF-7 の発現を亢進させる 1 又は複数種の薬剤（以下、「FGF-7 発現亢進剤」と称する場合がある）を含有する皮膚外用剤を頭皮に塗布することにより達成される。好ましくは、前記薬剤はアデノシンである。

#### 【0011】

別の観点において、本発明は、アデノシン及びその誘導体、例えば、アデノシン 5' - リン酸、アデノシン 5' - リン酸の塩、並びに CCPA、C1-IB-MECA 及び NECA から成る群から選ばれる薬剤を活性成分として含有する FGF-7 発現亢進組成物を提供する。

好適な態様において、FGF-7 の発現が亢進されるのは毛乳頭細胞又は外毛根鞘細胞である。

好適な態様において、前記薬剤はアデノシンである。

好適な態様において、前記組成物は頭皮に塗布することにより毛髪の太毛化を維持・促進させる皮膚外用剤である。

#### 【0012】

更なる別の観点において、本発明は毛髪の太毛化を維持・促進させる薬剤のスクリーニング方法であって、候補薬剤を細胞、好ましくは毛包の細胞、より好ましくは毛乳頭細胞又は外毛根鞘細胞に適用し、当該細胞の FGF-7 の発現を亢進させる薬剤を選定することの特徴とする方法を提供する。好ましくは、毛乳頭細胞は不死化毛乳頭細胞である。

好適な態様において、上記細胞の FGF-7 の発現の亢進は、細胞中の FGF-7 の量を測定することにより決定される。

さらに好適な態様において、上記測定は FGF-7 に特異的な抗体を利用する ELISA 法又は RIA 法による。

さらに好適な態様において、上記細胞の FGF-7 の発現の亢進は、細胞から抽出された FGF-7 をコードする mRNA の量を測定することにより決定される。

さらに好適な態様において、上記 mRNA の測定は RT-PCR 法（逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応法）により行う。

#### 【発明の効果】

##### 【0013】

本発明は、毛髪の太毛化の維持・促進に効果的な方法及びそのための組成物の提供を可能にする。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0014】

以下、本発明の実施の形態について説明する。

本発明は、毛包の細胞、好ましくは毛乳頭細胞におけるケラチノサイト増殖因子（FGF-7）の発現を亢進させることを特徴とする、毛髪の太毛化を維持・促進する方法を提供する。

##### 【0015】

本発明でいう太毛化とは、一般に毛根の矮小化によるうぶ毛化が抑制され、毛髪の太さが維持される又は太くなることをいう。太毛化効果の有無の判定は、毛髪の太さや質に個人差があり、従って個人別にされることが好ましいが、一般には、頭部の所定面積の領域、例えば  $1\text{ cm}^2$ 、 $2\text{ cm}^2$ 、 $5\text{ cm}^2$  における所定の直径の毛髪、例えば直径  $40\text{ }\mu\text{m}$ 、 $60\text{ }\mu\text{m}$ 、 $80\text{ }\mu\text{m}$  又は  $100\text{ }\mu\text{m}$  以上の毛髪の本数が、本発明に係る FGF-7 発現亢進剤の頭皮への適用、例えば 1 ヶ月、3 ヶ月、又は 6 ヶ月以上の継続的な適用の結果、実質的に減少しなかった場合、例えばその減少率が 10% 未満、好ましくは 5% 未満の場合、太毛が維持されたと判定され、例えば直径  $40\text{ }\mu\text{m}$ 、 $60\text{ }\mu\text{m}$ 、 $80\text{ }\mu\text{m}$  又は  $100\text{ }\mu\text{m}$  の毛髪の本数が実質的に増加した場合、例えばその増加率が 5% 以上、好ましくは 10% 以上、より好ましくは 20% 以上の場合、太毛化が促進されたものと判定できる。

##### 【0016】

毛包の細胞、好ましくは毛乳頭細胞における FGF-7 の発現の亢進は、アデノシン及びその誘導体、例えば、アデノシン 5'-リン酸、アデノシン 5'-リン酸の塩、並びに CCPA、CI-IB-MECA 及び NECA から成る群から選ばれる毛包の細胞における FGF-7 の発現を亢進させる 1 又は複数種の薬剤を含有する皮膚外用剤を頭皮に塗布することにより達成される。

##### 【0017】

アデノシンは、リボヌクレオシドの一つで塩基部分にプリン誘導体であるアデニンを含むものである。アデノシン 5'-リン酸は、5'-アデニル酸とも呼ばれ、アデノシンのリボースの 5' 位のヒドロキシル基にリン酸が 1 分子結合したヌクレオチドである。

##### 【0018】

また、アデノシン 5'-リン酸の塩において、塩を形成する対イオンとしては、酸と対イオンを形成する物質であればいずれの物質でもよく、例えば、ナトリウム、カリウム、カルシウム等を挙げることができる。また、アデノシン 5'-リン酸の塩としては、その水和物を使用することもできる。

##### 【0019】

CCPA、CI-IB-MECA、NECA はアデノシン類縁物資である。CCPA、CI-IB-MECA、NECA はシグマ社から入手できる。

##### 【0020】

上記アデノシン、アデノシン 5'-リン酸及びアデノシン 5'-リン酸の塩、CCPA、CI-IB-MECA 及び NECA は試薬として市販されているものを使用することができる。

##### 【0021】

本発明に係る FGF-7 発現亢進組成物は、皮膚外用剤、好ましくは頭皮外用剤、例えば育毛料又は養毛料であり得る。

#### 【0022】

本発明に係る FGF-7 発現亢進組成物は、上記 FGF-7 発現亢進剤を全量中、例えば 0.01～20.0 質量%、好ましくは 0.1～10.0 質量%で含む。この配合量が当該組成物の全量の 0.01 質量%未満では上記成分による太毛化効果が十分に発揮されないため好ましくなく、また 20.0 質量%を超えると調剤上支障をきたす傾向が顕著となり、好ましくない場合がある。

#### 【0023】

本発明に係る FGF-7 発現亢進組成物、特に皮膚外用剤は、皮膚に直接に塗布または散布する経皮投与により投与することができる。また、その投与量は、外用剤の具体的態様、使用者の年齢、症状等により変化するので明確には特定することはできないが、ヒトに投与する場合、上記 FGF-7 発現亢進剤が、体重 1Kg および 1 日当り、一般に 0.01～100.0mg、好ましくは 0.1～10.0mg 投与されるような量であり、この量を 1 日 1 回又は 2～4 回に分けて投与することが好ましい。

#### 【0024】

本発明に係る FGF-7 発現亢進組成物、特に皮膚外用剤は、ヒトを始めとする哺乳動物において、優れた太毛化維持・促進作用を示し、ヘアケア用の医薬品、医薬部外品又は化粧品として有用である。

#### 【0025】

本発明に係る FGF-7 発現亢進組成物、特に皮膚外用剤が採り得る剤型は、好ましくは外皮に適用可能な外用剤の剤型、例えば、液状、乳液状、クリーム状、エアゾール状等の剤型を選択することができる。また、本発明の組成物の形態も任意であり、例えば、トニック、ヘアークリーム、ムース、シャンプー、リンス、乳液、化粧水、パック、エアゾール剤等の形態を採ることができる。本発明の組成物は外皮に塗布して使用するのが特に好ましい。塗布方法は特に限定されるものではないが、例えば頭皮に 1 日 1 回以上、例えば 1 日 1 から 3 回、塗布する皮膚面積に応じて適量、例えば 1～5ml 塗布するのが好ましい。

#### 【0026】

本発明に係る FGF-7 発現亢進組成物、特に皮膚外用剤においては、必須成分である上記香料に加えて、必要に応じて、かつ本発明の所期の効果を損なわない限り、化粧品、医薬部外品、医薬品等において一般的に用いられる、各種の油性又は水性成分、保湿剤、増粘剤、防腐剤、酸化防止剤、香料、色剤、各種の薬剤等を配合することができる。

#### 【0027】

例えば、高級脂肪酸、固形パラフィン、流動パラフィン、シリコーン油、スクワラン、モノオレイン酸グリセリル、オリーブ油、イソプロピルミリステート、高級アルコール等の油分；グリセリン、ヒアルロン酸、プロピレングリコール、マルチトール、アテロコラーゲン、乳酸ナトリウム等の保湿剤；マルメロ粘質物、カルボキシビニルポリマー、キサンタンガム等の増粘剤；ニコチン酸アミド、ニコチン酸ベンジル、ビタミン E アセテート、センブリ抽出物、塩化カルプロニウム、アセチルコリン誘導体等の血管拡張剤；セリン、メチオニン、アルギニン等のアミノ酸類；ビタミン B6、ビタミン E 類、ビオチン、パントテン酸類等のビタミン類；ニコチン酸、ニコチン酸メチル、ニコチン酸トコフェロール等のニコチン酸エステル類；セファランチン等の皮膚機能亢進剤；エストラジオール等の女性ホルモン剤；グリチルリチン酸、グリチルレチン酸、アズレン等の消炎剤；ヒノキチオール、ヘキサクロロフェン、ペンザルコニウムクロリド、セチルピリジニウムクロリド、ウンデシレン酸、トリクロロカルバニリド、ピチオノール等の抗菌剤；メントール等の清涼剤；サリチル酸、亜鉛類、乳酸類等；クエン酸等の有機酸類を配合することができる。

#### 【0028】

本発明に係る FGF-7 発現亢進組成物、特に皮膚外用剤は更に上記 FGF-7 発現亢



進剤以外で育毛作用が認められている、既知の育毛成分、例えばミノキシジル、サイクロスポリン等を加えることにより、さらに効果的な育毛効果が期待され得る。

**【0029】**

本発明は更に毛髪の太毛化を維持・促進させる薬剤のスクリーニング方法を提供する。この方法は、候補薬剤を細胞、好ましくは毛包の細胞、より好ましくは毛乳頭細胞又は外毛根鞘細胞に適用し、当該細胞の FGF-7 の発現を亢進させる薬剤を選定することを特徴とする。

**【0030】**

毛乳頭細胞として、ヒト由来の正常な毛乳頭細胞、あるいは入手が容易であり、しかも増殖速度が速い点で有利な不死化毛乳頭細胞、例えば特開平11-89565号公報に記載のとおり、SV40 large T 抗原遺伝子による形質転換により得られる不死化ヒト毛乳頭細胞などを使用することもできる。また、スクリーニングに際しては、毛乳頭細胞の他に、FGF-7 を産生する間葉系細胞、例えばヒトから単離される皮膚線維芽細胞や、他の毛包由来の細胞、例えば外毛根鞘細胞などを用いることもできる。

**【0031】**

細胞中の FGF-7 発現の亢進は、例えば細胞中の FGF-7 の量を測定することにより決定される。好ましくは、この測定はヒト FGF-7 に特異的な抗体を利用し、当業界において周知の方法、例えば蛍光物質、色素、酵素等を利用する免疫染色法、ウェスタンブロット法、免疫測定方法、例えば ELISA 法、RIA 法等、様々な方法により実施できる。また、細胞から RNA を抽出し、ヒト FGF-7 をコードする mRNA の量を測定することにより決定することもできる。mRNA の抽出、その量の測定も当業界において周知であり、例えば RNA の定量は逆転写反応後、定量ポリメラーゼ連鎖反応法 (RT-PCR) により行われる。例えば、定量 PCR は以下のプライマーの組み合わせを利用して実施できる。

**【0032】**

組み合わせ 1

Forward Primer: 5' -CATGAACACCCGGAGCACTAC-3' (NM\_002009:419-439) (配列番号 1)

Reverse Primer: 5' -CACTGTGTTTCGACAGAAGAGTCTTC-3' (NM\_002009:669-646) (配列番号 2)

PCR 産物の大きさ: 251bp

**【0033】**

組み合わせ 2

Forward Primer: 5' -CACAAATGGATACTGACATGGA-3' (NM\_002009: 449-470) (配列番号 3)

Reverse Primer: 5' -TCACTCTTATATCCCCTCCTTC-3' (NM\_002009: 644-623) (配列番号 4)

PCR 産物の大きさ: 196bp (J Clin Endocrinol Metab 88(2), 773-, 2003)

**【0034】**

組み合わせ 3

Forward Primer: 5' -CTTTGCTCTACAGATCATGCTTTC-3' (NM\_002009: 480-503) (配列番号 5)

Reverse Primer: 5' -TTGCCATAGGAAGAAAGTGGGCTG-3' (NM\_002009: 1022-999) (配列番号 6)

PCR 産物の大きさ: 543bp (J Clin Invest 92, 2408-, 1993)

**【0035】**

以下、実施例により、本発明をさらに具体的に説明するが、この実施例により、本発明の技術的範囲が限定的に解釈されるべきものではない。なお、以下の実施例等で、配合量を表す数値は、特に断わらない限り、配合される対象全体に対する質量%で表される。

**【実施例】**

## 【0036】

実験1: 定量PCR実験によるFGF-7の発現亢進の検討(1)

## 1) 細胞の培養

ヒト毛乳頭細胞 (dermal papillae cell; DPC) は整形手術の副産物として生じたヒト頭皮より単離・培養後凍結保存しておいた34歳女性由来のDPCを用いた。細胞密度が $1.0 \sim 1.5 \times 10^4$  個/cm<sup>2</sup> になるように播種し、MEM(GIBCO)+10%FBS中、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。2回/週の割合で培地交換を行い、細胞が集密に達したときは(播種から10日~20日後) 0.25%トリプシンで細胞をディッシュから剥がして回収し、再び $1.0 \sim 1.5 \times 10^4$  個/cm<sup>2</sup>の密度で播種した。

## 【0037】

## 2) 培養細胞の薬剤処理

解凍後1-3回継代・培養したDPCを24ウェルプレートに $4.0 \times 10^4$  個/ウェルの密度で播種し、4日後、亜集密の細胞にアデノシンを $100 \mu\text{M}$ の濃度に溶解したMEM(血清無添加)に交換した。コントロール細胞は、MEM(血清無添加)のみを用い、同様に処理した。

## 【0038】

## 3) RT-PCR

アデノシン添加の2、4、8、24時間後、MagNAPureLC(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)で培養細胞からmRNAを抽出し、逆転写酵素SuperScriptII(Invitrogen)のキットを用いてcDNAを合成した。cDNAを鋳型にLightCycler(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)で二重鎖DNAの副溝に結合する蛍光色素CyberGreen Iを用いたりアルタイムPCRにより発現量の比較を行った。詳しくは、LightCycler-FastStart DNAマスターSYBR Green Iキット(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)を用い、添付のマニュアルに従って全量 $20 \mu\text{l}$ の反応液(MgCl<sub>2</sub> 2mM, Forward 及びReverse Primer各 $0.25 \mu\text{M}$ )を調製し、LightCyclerでPCR反応(酵素活性化95℃/10分、熱変性95℃/15秒、アニーリング58℃/5秒、伸長反応72℃/10秒、熱変性~伸長反応サイクルを40回)を行い、各サイクルの伸長反応終了時の蛍光強度をモニタリングした。この蛍光強度はその時点におけるPCR産物量を反映している。遺伝子の発現量は、PCR産物の指数関数的増幅期において初期鋳型量AのPCR産物YがPCRのサイクル数Xに対して $Y=A \times 2^X$ を満たしながら増幅されるものと仮定して、一定量のPCR産物が得られるまでのサイクル数から相対値を算出した。以下に本研究で用いたFGF-7増幅用プライマーを示す。

Forward Primer: 5' -CATGAACACCCGAGCACTAC-3' (NM\_002009:419-439) (配列番号1)

Reverse Primer: 5' -CACTGTGTTTCGACAGAAGAGTCTTC-3' (NM\_002009:669-646) (配列番号2)

PCR産物の大きさ: 251bp

## 【0039】

図1にその結果を示す。この図から明らかなとおり、アデノシンで処理された毛乳頭細胞においてFGF-7の発現の顕著な亢進が認められた。

## 【0040】

実験2: 定量PCR実験によるFGF-7の発現亢進の検討(2)

実験1と同様にして、但しアデノシンの濃度を $10 \mu\text{M}$ 及び $100 \mu\text{M}$ の二通りとし、アデノシン処理時間を3時間として、RT-PCR実験を行った。その結果を図2に示す。この図から明らかなとおり、アデノシンで処理された毛乳頭細胞においてFGF-7の発現が、アデノシン濃度依存的に亢進することが確認された。

## 【0041】

実験3: 定量PCR実験によるFGF-7の発現亢進の検討(3)

実験1と同様にして、但しアデノシンの代わりにアデノシン類縁物質であるCCPA(2-クロロ-N<sup>6</sup>-シクロペンチルアデノシン) ( $100 \mu\text{M}$ )、C1-IB-MECA(2-クロロ-N<sup>6</sup>-(3-ヨードベンジル)-9-[5-(メチルカルバモイル)-β

ーDーリボフラノシル] アデニン) ( $50\mu\text{M}$ ) 又はNECA (N-エチルカルボキシアミドアデノシン) ( $10\mu\text{M}$ ) を用い、薬剤処理時間を3時間として、RT-PCR実験を行った。(尚、薬剤の溶解性が低い場合には薬剤無添加のコントロールを含めた全ての薬剤入り培地においてDMSO終濃度が0.1%となるよう調製してもよい。)

#### 【0042】

その結果を図3に示す。この図から明らかなとおり、CCPA、CI-IB-MECA又はNECAで処理された毛乳頭細胞においてもFGF-7の発現の顕著な亢進が認められた。

#### 【0043】

実験4: アデノシンの毛髪に対する太毛化効果の検討

以上のFGF-7亢進効果の見出された各種薬剤のうち、アデノシンを、毛髪の太毛化効果について以下の方法で検討した。

下記の組成1を有するアデノシン含有育毛料及びコントロールとして下記の組成2を有するニコチン酸アミド含有育毛料を、30～50歳の男性型脱毛を呈する男性被験者(各群51名)の皮髪頭部に対し1日2回、適量(約2～3ml)にて6ヶ月間にわたり塗布使用し、使用開始時との比較におけるアデノシンの太毛化効果について調べた。本実験においては、うぶ毛は $40\mu\text{m}$ 未満の直径を有する毛髪とし、直径 $60\mu\text{m}$ 以上のものを太毛とし、直径 $80\mu\text{m}$ 以上のものは顕著に太毛化した毛髪とした。アデノシン含有育毛料を使用してから6ヶ月目において、使用開始時と比べ、うぶ毛は7%以上減少し、また直径 $60\mu\text{m}$ 以上の太毛は10%以上増加した。更に、直径 $80\mu\text{m}$ 以上の太毛は5%以上増加した。アデノシン含有育毛料を継続的に使用すると、ニコチン酸アミド含有育毛料を使用したときと比べ、これらの太毛の増加量が顕著に高かった。その結果を図4に示す。

#### 【0044】

尚、アデノシン含有育毛料とニコチン酸アミド含有育毛料の毛髪密度に対する効果を調べたところ、両者の間に統計学的に有意な差は認められなかった(データは示さない)。従って、培養毛乳頭細胞においてFGF-7発現亢進効果を示すアデノシンが特に毛髪の太毛化の維持・促進に有効であることが明らかとなった。

#### 【0045】

アデノシン含有育毛料(組成1)

成分	配合量(質量%)
アデノシン	0.75
イソステリルアルコール	0.50
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油	0.50
ビニルピロリドン-N, N-ジメチルエチルメタクリル酸	0.50
共重合体ジエチル硫酸塩液	
ジプロピレングリコール	10.0
エタノール	50.0
精製水	残量
DL-リンゴ酸	適量

#### 【0046】

ニコチン酸アミド含有育毛料(組成2)

成分	配合量(質量%)
ニコチン酸アミド	0.10
イソステリルアルコール	0.50
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油	0.50
ビニルピロリドン-N, N-ジメチルエチルメタクリル酸	0.50
共重合体ジエチル硫酸塩液	
ジプロピレングリコール	10.0
エタノール	50.0



精製水  
DL-リンゴ酸

残量  
適量

【0047】

実験5: 定量PCR実験によるFGF-7の発現亢進の検討(4)

実験1と同様に、但しDPCとしてヒト不死化毛乳頭細胞(特開平11-89565号公報に記載のSV40 large T抗原遺伝子による形質転換により得られる不死化ヒト毛乳頭細胞)を用い、薬剤処理時間を2時間として、RT-PCR実験を行った。

【0048】

その結果を図5に示す。この図から明らかなとおり、毛乳頭細胞としてヒト不死化毛乳頭細胞を用いても、アデノシンによるFGF-7の発現の亢進が確認された。従って、FGF-7発現亢進剤のスクリーニングにおいて、ヒト不死化毛乳頭細胞を用いることもできることが明らかとなった。

【0049】

実験6: 定量PCR実験によるFGF-7の発現亢進の検討(5)

1) 細胞の培養

ヒト外毛根鞘細胞(outer root sheath cell:ORS)は整形手術の副産物として生じたヒト頭皮より単離・培養後凍結保存しておいた40歳女性由来のORSを用いた。細胞密度が $1.0 \sim 1.5 \times 10^4$ 個/cm<sup>2</sup>になるように播種し、K-SFM培地(GIBCO)中、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。P3のORSを24ウェルプレートに $2.0 \times 10^4$ 個/ウェルの密度で播種して3日後、亜集密の細胞にアデノシンを10又は100 μMの濃度に溶解したKBM培地(クラボウ)に交換した。コントロール細胞は、KBM培地のみを用い、同様に処理した。RT-PCRは実験1と同様に行った。

図6にその結果を示す。この図から明らかなとおり、アデノシンで処理された外毛根鞘細胞においても、毛乳頭細胞と同様、FGF-7の発現の顕著な亢進が認められた。

【産業上の利用可能性】

【0050】

本発明は、毛髪の太毛化の維持・促進に効果的な方法及びそのための組成物の提供を可能にする。

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1】毛乳頭細胞におけるアデノシンのFGF-7発現亢進効果を示す。

【図2】毛乳頭細胞におけるアデノシンのFGF-7発現亢進効果を示す。

【図3】毛乳頭細胞におけるアデノシン類縁物質のFGF-7発現亢進効果を示す。

【図4】アデノシン含有育毛料の太毛化効果を示す。

【図5】ヒト不死化毛乳頭細胞におけるアデノシンのFGF-7発現亢進効果を示す。

【図6】外毛根鞘細胞におけるアデノシンのFGF-7発現亢進効果を示す。



## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Shiseido Co. Ltd.

&lt;120&gt; Method and Composition for Thickening Hair

&lt;130&gt; 1034465

&lt;160&gt; 6

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Forward Primer

&lt;400&gt; 1

catgaacacc cggagcacta c 21

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Reverse Primer

&lt;400&gt; 2

cactgtgttc gacagaagag tcttc 25

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Forward Primer

&lt;400&gt; 3

cacaaatgga tactgacatg ga 22

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Reverse Primer

&lt;400&gt; 4

tcactcttat atcccctcct tc 22

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Forward Primer



<400> 5  
ctttgctcta cagatcatgc tttc

24

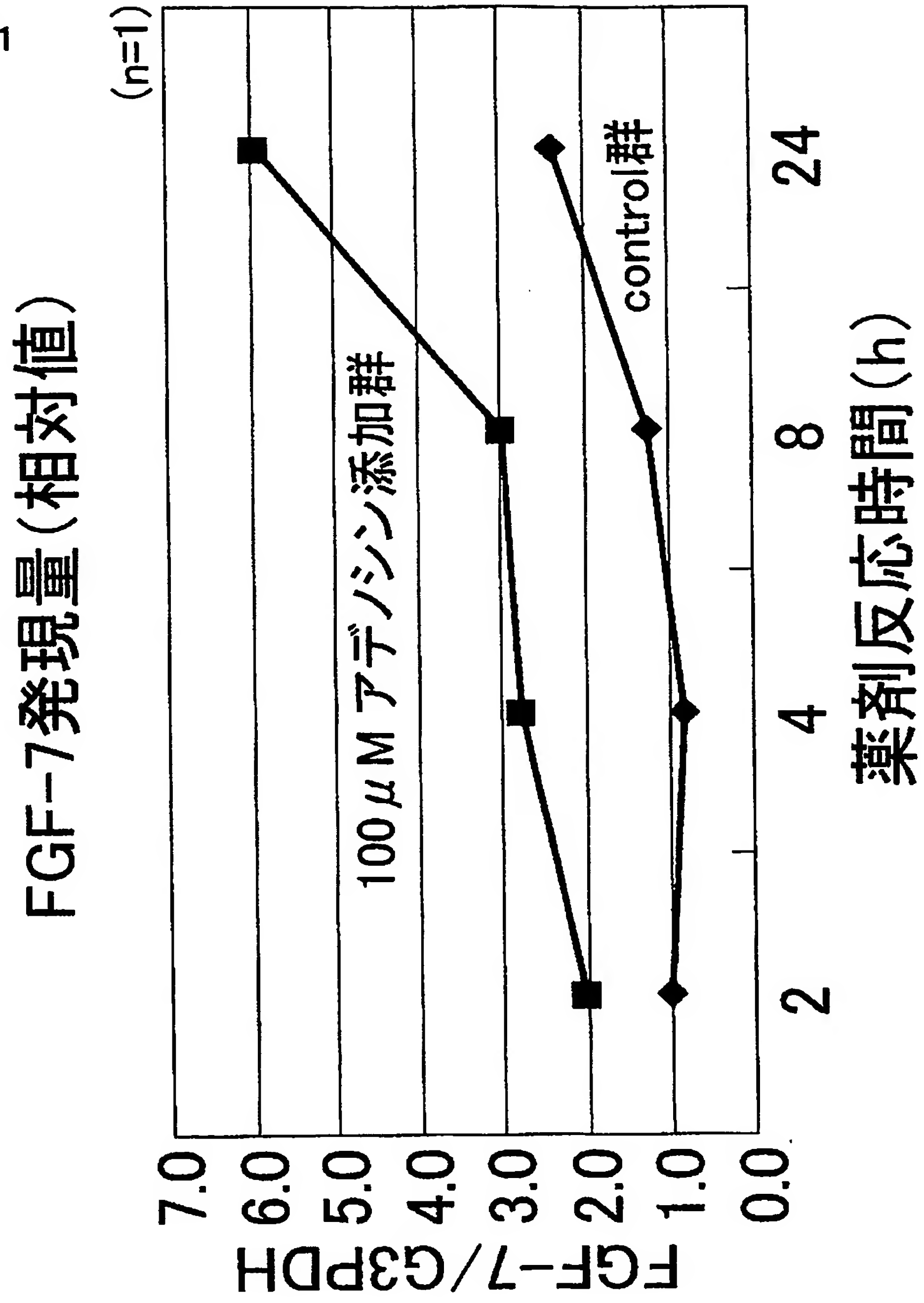
<210> 6  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<223> Reverse Primer

<400> 6  
ttgccatagg aagaaagtgg gctg

24

【書類名】 図面  
【図 1】

図 1

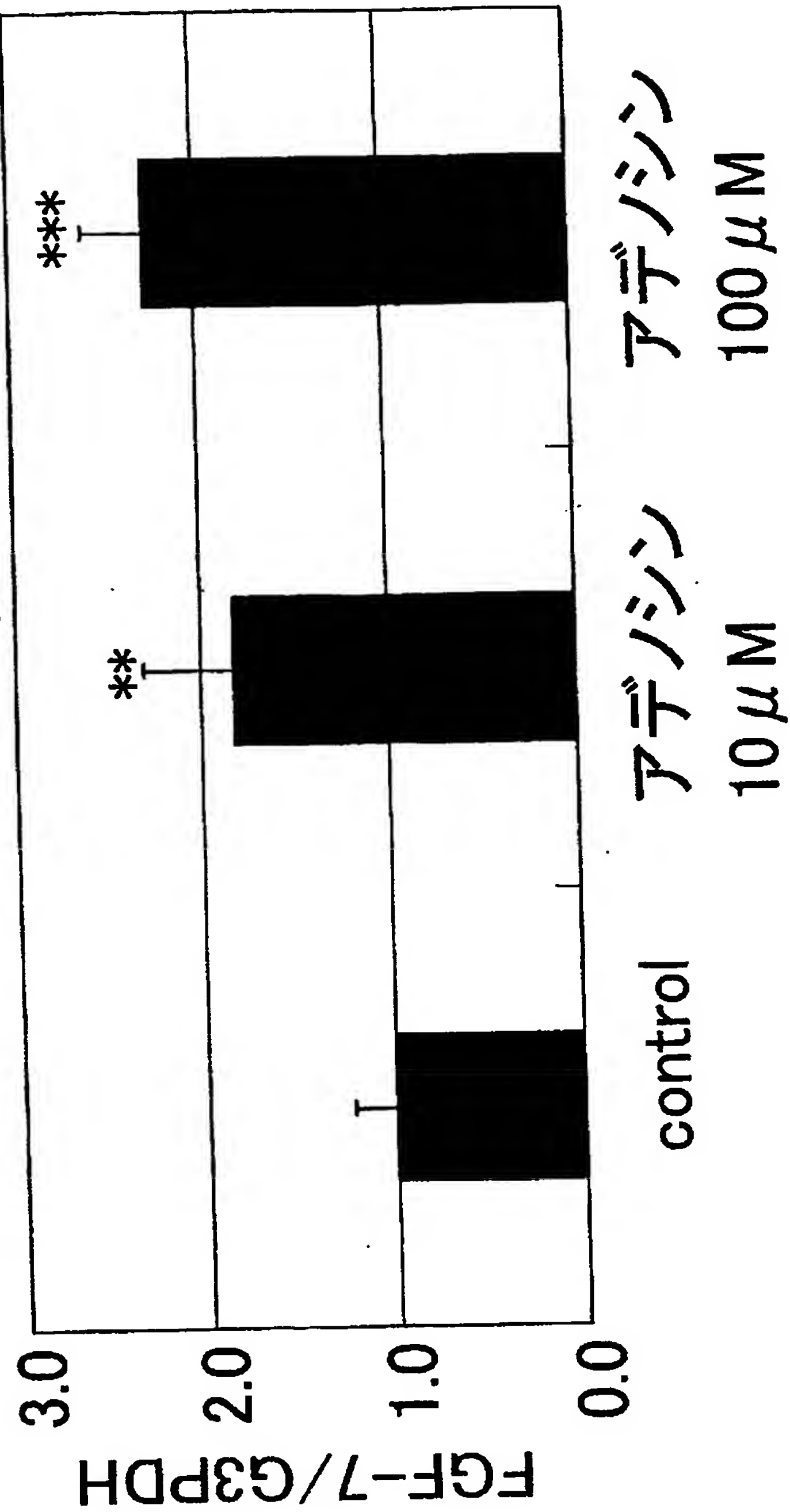


【図2】

図2

薬剤添加3時間後のFGF-7相対発現量

\*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, (n=6)



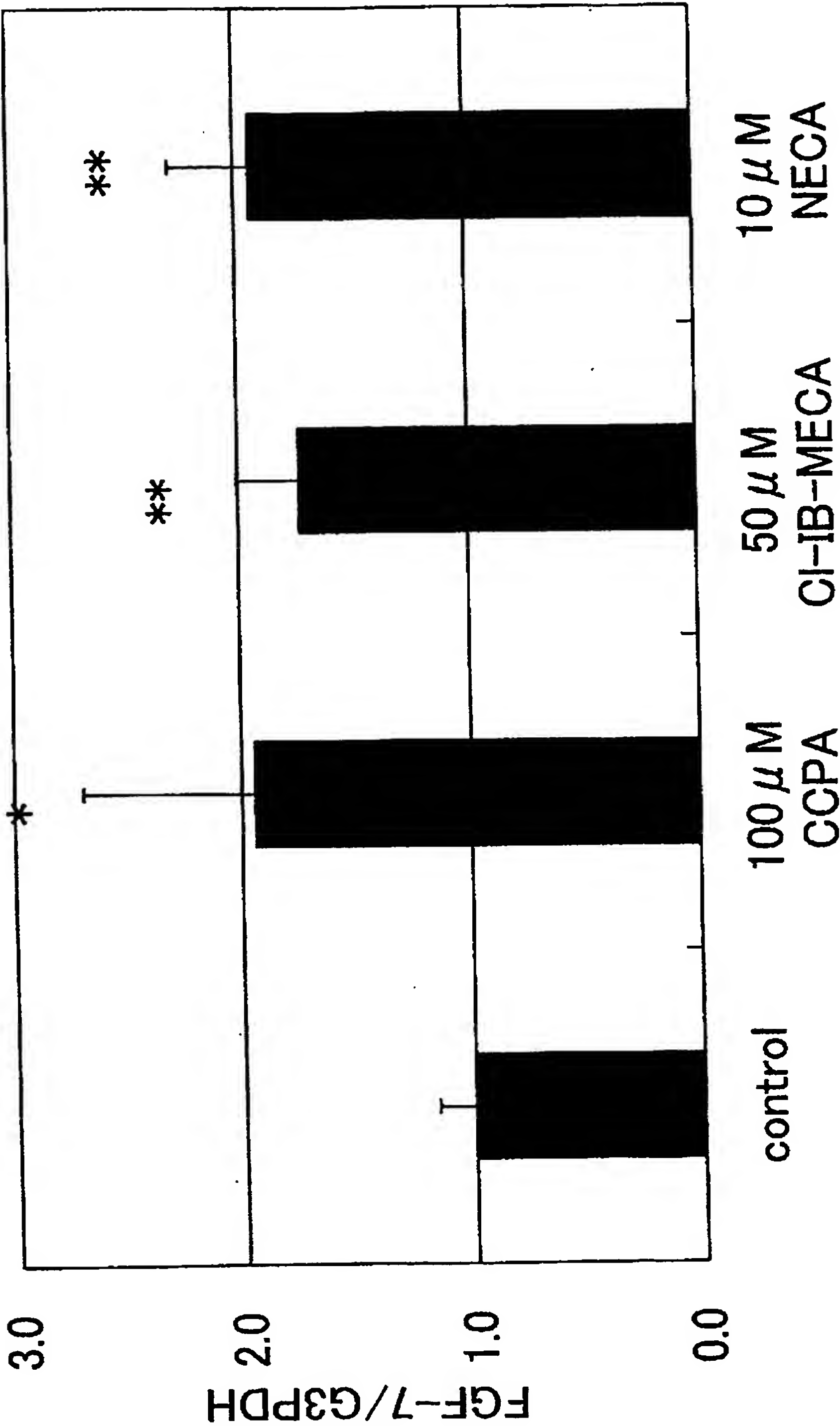


【図3】

図3

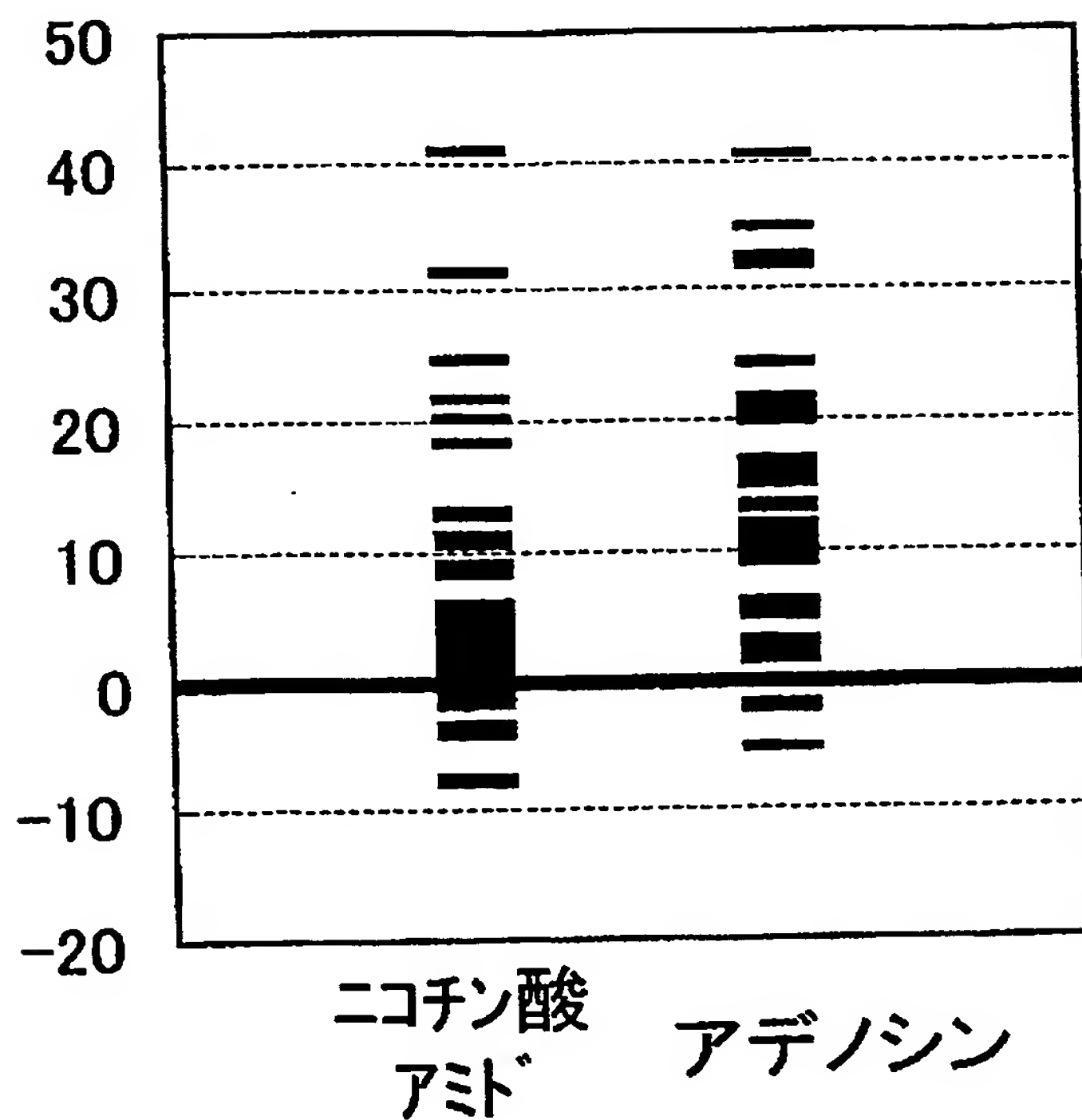
薬剤添加2時間後のFGF-7相対発現量  
(real time PCR: n=4)

\* p<0.05  
\*\* p<0.01



【図 4】

図4 80  $\mu$ m以上の太毛率

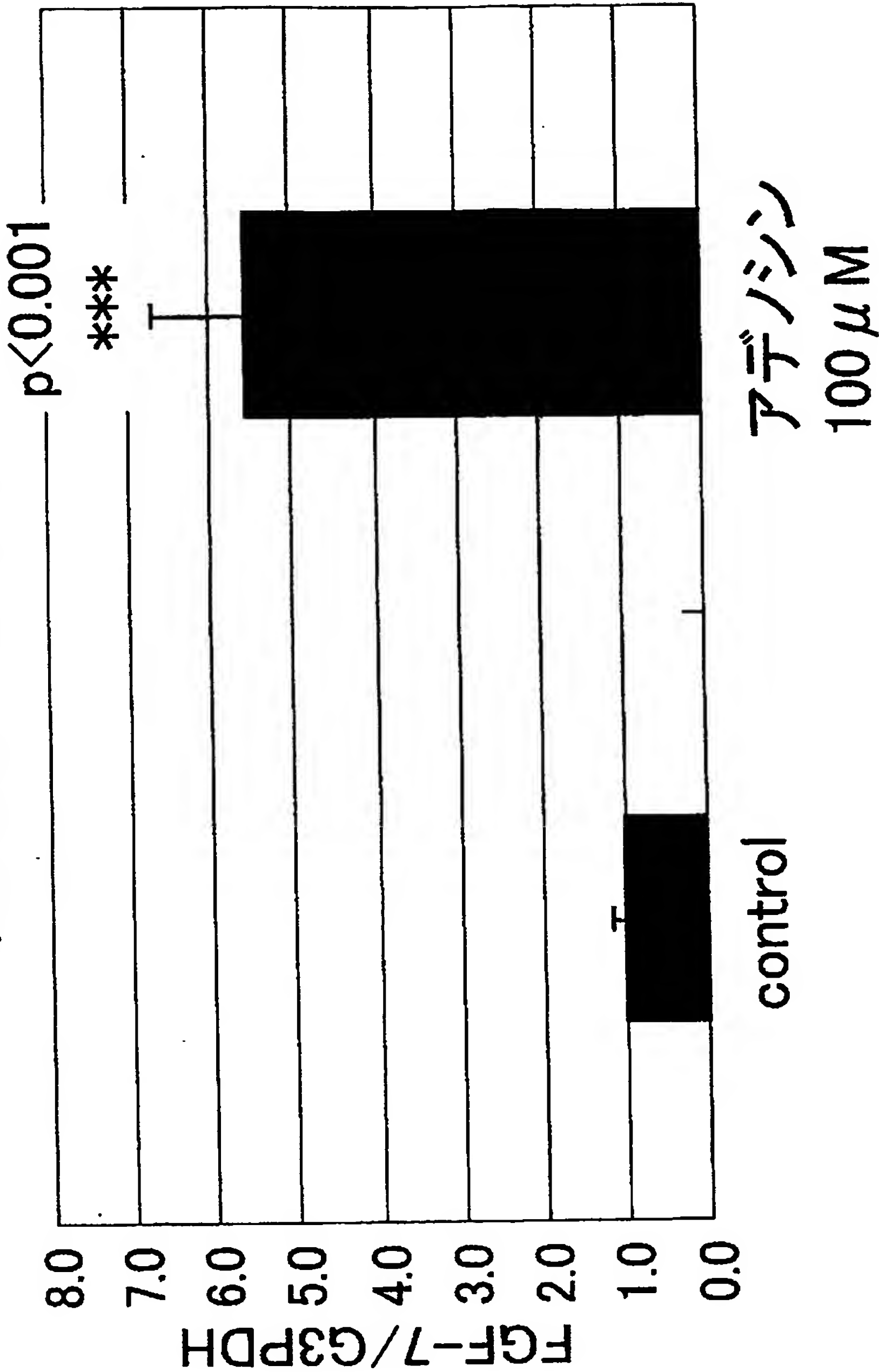


【図 5】

図 5

薬剤添加2時間後のヒト不死化毛乳頭細胞における  
FGF-7相対発現量

(real time PCR : n=4)



【図 6】

図6

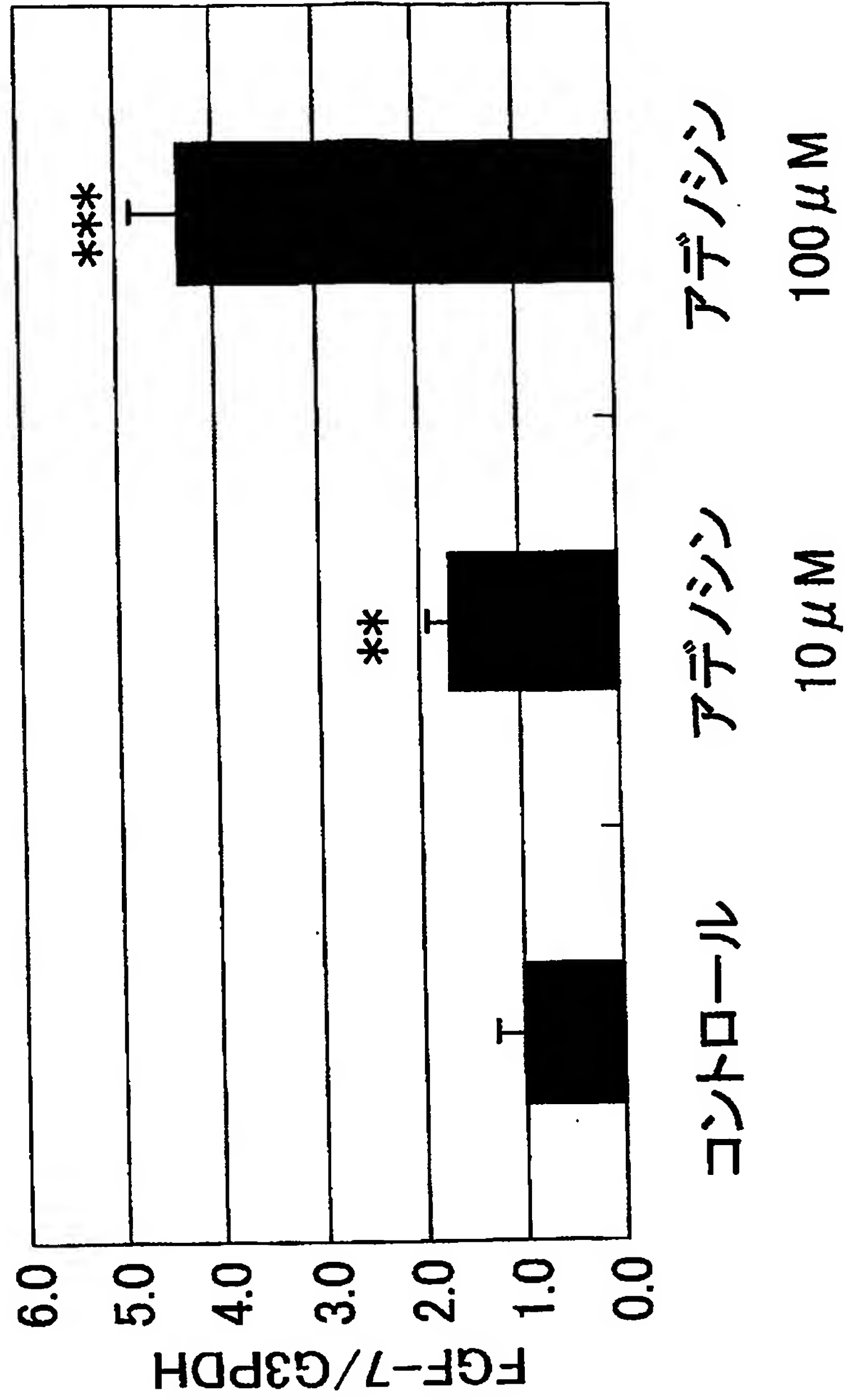
薬剤添加3時間後のFGF-7相対発現量

(real time PCR: n=6)

細胞: ORS(40歳女性由来)

\*\* p<0.01

\*\*\* p<0.001







【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、毛髪の太毛化のメカニズムの生化学・分子生物学レベルでの解明、さらには毛髪の太毛化を維持・促進する方法及びそのための皮膚外用組成物の提供を課題とする。

【解決手段】 本発明は毛包の細胞、好ましくは毛乳頭細胞におけるケラチノサイト増殖因子（F G F - 7）の発現を亢進させることにより毛髪の太毛化を維持・促進する方法、並びにアデノシン及び／又はその誘導体を含むF G F - 7の発現を亢進させる組成物、特に毛髪の太毛化を維持・促進するための頭皮外用剤を提供する。

【選択図】 図 1



特願 2 0 0 3 - 3 8 1 4 7 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 1 9 5 9 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区銀座 7 丁目 5 番 5 号

氏 名

株式会社資生堂

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**